

# par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*

Olivier Geffard<sup>a\*</sup>, Edouard His<sup>a</sup>, Hélène Budzinski<sup>b</sup>, Matthias Seaman<sup>c</sup>, Philippe Garrigues<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ifremer, quai Silhouette, 33120 Arcachon, France

<sup>b</sup> Laboratoire de physico-toxico-chimie des systèmes naturels, Upres A 5472, université de Bordeaux-1, 33405 Talence, France

<sup>c</sup> Institut für Meereskunde 24105 Kiel, Germany

Reçu le 31 juillet 2001 ; accepté le 1<sup>er</sup> octobre 2001

Présenté par Lucien Laubier

**Abstract – In situ monitoring of sea water quality with the embryo-larval bioassay of *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*.** Embryos and larvae of bivalves are frequently used in marine ecotoxicology for the purpose of assessing seawater quality, because they are very sensitive to pollutants and provide rapid responses. Laboratory studies, however, cannot accurately simulate natural conditions. We conducted bivalve embryo-larval studies in situ at the marina of Arcachon (south-west French Atlantic coast), in order to assess ‘biological quality’ of the water. One experiment conducted in winter 1999 (temperatures of 10 °C) with embryos of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, has shown that such tests are practicable in winter at low temperatures. This study did not show any deterioration in ‘biological quality’ of the water. Four series of experiments were subsequently performed during summer 2000 (ambient water temperatures of 19 to 22.4 °C) with embryos of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. The results show that the ‘sea water biological quality’ deteriorates from the port entrance towards its inner part. To our knowledge, this is the first investigation of the marine environment in which bivalve embryos have been used in situ. They are very suitable for this type of study, because bivalve embryos and larvae are more sensitive to pollutants than the adults, and also because they belong to euryhaline species and the embryos tolerate summer temperatures (both species) as well as winter temperatures (mussels), allowing biomonitoring to be conducted all over the year. © 2001 Académie des Sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

**in situ / embryo-larval bioassays / biological quality of sea water / *Crassostrea gigas* / *Mytilus galloprovincialis***

**Résumé –** Les tests embryo-larvaires de bivalves sont fréquemment utilisés en écotoxicologie marine, compte tenu de leur grande sensibilité et de la rapidité des réponses. Toutefois, les résultats obtenus en laboratoire peuvent ne pas correspondre exactement aux effets réels qui se produisent dans le milieu naturel. Des essais préliminaires de tests embryo-larvaires de bivalves in situ ont permis d’évaluer la ‘qualité biologique’ des eaux du port de plaisance d’Arcachon. Une expérience réalisée en hiver 1999 (10 °C) chez *Mytilus galloprovincialis* a montré que ces tests peuvent être pratiqués pendant cette

\*Correspondence and reprints.

Adresse e-mail : [ogeffard@ifremer.fr](mailto:ogeffard@ifremer.fr) (O. Geffard).

période de l'année. Dans ce dernier cas, aucune modification de la 'qualité biologique' de l'eau du port n'a été observée. Quatre séries d'observations, ont ensuite été conduites à l'aide d'embryons de *Crassostrea gigas* au cours de l'été 2000 (19 à 22,4 °C). Une détérioration de la 'qualité biologique' des eaux de surface a été mise en évidence lorsque l'on passe de l'entrée à la partie intérieure du port. Il s'agit, à notre connaissance, des premiers tests réalisés in situ dans le milieu marin à l'aide d'embryons de bivalves, dont on sait qu'ils sont beaucoup plus sensibles aux effets des altéragènes que les stades adultes. Ces organismes présentent l'avantage d'être euryhalins, de se développer à des températures très variables dans le cas de la moule méditerranéenne, enfin, des géniteurs mûrs sont souvent disponibles en toutes saisons. Par conséquent ils permettent les opérations de surveillance en zones estuariennes, côtières et marines et ceci toute l'année. © 2001 Académie des Sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

in situ / tests embryo-larvaires / qualité biologique de l'eau de mer / *Crassostrea gigas* / *Mytilus galloprovincialis*

## . Abridged version

Larvae of oysters (*Crassostrea*) and mussels (*Mytilus*) have become standard organisms in ecotoxicological laboratory studies, because they are very sensitive to pollutants and yield rapid results. Mediterranean mussels, *M. galloprovincialis*, are useful for experiments throughout the year, because some ripe adults are to be found at almost any season; oysters (*C. gigas*), on the other hand, require about 20 °C or more for spawning and embryonal development. Both species are euryhaline, and their embryogenesis is normal at salinities as low as 20; both of them are therefore appropriate for ecotoxicological studies in the coastal regions most strongly affected by pollution. The present study shows that bivalve larvae can be used perfectly well for in situ bioassays.

The biological quality of the water was studied at the port of Arcachon (figure 1), which has space for 2 400 medium-size yachts, 80 % of which never leave their berth, despite being inhabited during the summer. The boats are a source of increasing pollution. The eastern part of the port harbours some thirty fishing vessels more than 10 m in length. The studies were conducted at a depth of 1 m at the entrance (A), middle (B) and inner part (C) of the port, as well as outside the breakwater (D) at the commercial port situated on a channel of the Bay (Arams). The experiments were conducted in the following environmental conditions:

- Winter (*M. galloprovincialis*): during a period of neap tides from 10 to 14 January 1999 at a temperature of 9.8 to 10.4°C and salinity of 31.
- Summer (*C. gigas*): on 15, 27 and 30 June 2000 at temperatures of 19 °C to 22.4 °C and salinity of 31 and on 21 July 2000 at 21.6 to 22.4 °C and the same salinity.

The embryo-larval tests were carried out as follows: the gametes were obtained by thermal stimulation of ripe adults, and fertilized in 0.2-µm filtered seawater (FSW). After 10 min, fertilized eggs (60 per mL) were transferred into bottles (3 per sea water to be treated).

At the end of the incubation period (24 h in oysters, 48 h in mussels) the number of abnormal larvae was determined in subsamples of 100 larvae per treatment. The test is valid if the level of abnormality is less than 20 % in controls.

The containers for the larvae were built from 1-L bottles of low-density polyethylene (figure 2). The bottom of each of the bottles was cut away and the opening covered with polyamide gauze of 30 µm mesh. The gauze was attached by heat-soldering, in order to avoid the use any glues, since all of the glues tested were found to be toxic to bivalve embryos. To permit the circulation of water through the bottle, the superior opening was equally covered with gauze fastened by a sealing ring and an open screw cap. The retention period of water in the containers was about 15 min, estimated with a solution of neutral red.

During winter experiments, the fertilized eggs of *M. galloprovincialis* required four days to complete embryogenesis. The controls (site D, channel of Arams) had abnormality levels of  $14.0 \pm 4.2$  % (mean percent value  $\pm 95$  % confidence limits, figure 3-D). The highest level of abnormality was found at site C with  $19.0 \pm 6.2$  %. The differences between sites were not significant. The long duration of embryogenesis during this experiment was due to low ambient temperatures. Even though no toxic effects were found, the experiment demonstrates that in situ bioassays can be carried out in winter.

Four experimental series were carried out in summer 2000 (figure 3-II). In the experiment of 15 June, abnormality levels were similar to those in winter, except at site B with  $27.3 \pm 9.7$  %. On 27 June, during a neap tide, abnormalities attained more than 50 % at sites B and C. On 30 June, abnormalities were low at the port entrance and at Arams ( $5.3 \pm 0.6$  % and  $6.0 \pm 2.5$  %, respectively), but high at sites B and C inside the port ( $41.3 \pm 7.6$  % and  $36.3 \pm 14.3$  %, respectively). On 21 July, during a spring tide, the same tendency was found, but with smaller differences ( $10.5 \pm 0.7$  % and

$11.0 \pm 4.2\%$  at sites A and D, respectively, as well as  $25.3 \pm 7.8\%$  and  $24.3 \pm 6.0\%$  at B and C, respectively).

In heavily polluted areas, controls are necessary to validate the data obtained. In further studies, we included, at each site, 3 tightly closed bottles containing FSW from an unpolluted site with the fertilized eggs as controls.

Embryotoxicity bioassays conducted in situ are more adequate for assessing the biological effects of pollutants than laboratory experiments, because toxic events may be underestimated due to incomplete sampling, and volatile or unstable toxicants may disappear on the way to the laboratory. The rationale for in situ testing

are: elimination of artefacts resulting from sampling and storage, as well as from various other artificial laboratory conditions affecting the real toxicity and bioavailability of contaminants as well as a better simulation of the natural environment. In comparison to sea urchin bioassays, bivalve embryo-larval bioassays are particularly interesting for monitoring purposes, because they may be used year-round, since spawners are available in mussels during winter and in oysters during summer; in addition, both species are euryhaline and may be used to test seawater as well as brackish water.

## 1. Introduction

Compte tenu du très important intérêt économique des huîtres et des moules, les essais de reproduction des bivalves marins en milieu contrôlé datent du début du 20<sup>e</sup> siècle. En particulier Prytherch [1], après avoir obtenu la métamorphose des larves de *Crassostrea virginica* en laboratoire de façon reproductible, proposait l'utilisation des véligères pour tester la toxicité des métaux lourds. Depuis cette époque, les effets de très nombreux micropolluants (polluants inorganiques ou organiques divers, effluents industriels) ont été évalués à l'aide des embryons et des larves de bivalves marins, huîtres du genre *Crassostrea* et moules du genre *Mytilus* en particulier. Ainsi, ces derniers se sont imposés très rapidement comme des «organismes tests» en écotoxicologie marine [2]. Ils répondent en effet aux critères définis par Stebbing et al. [3] pour être retenus comme tels. Avec les travaux de Woelke [4–6] chez *Crassostrea gigas* et de Dimick et Breese [7] chez *Mytilus edulis*, les embryons et les larves de bivalves ont été utilisés pour étudier la «qualité biologique» des eaux marines et estuariennes, notion qui avait été proposée par Wilson [8] et Bougis [9, 10], à la suite de travaux chez l'oursin, *Paracentrotus lividus*. A l'heure actuelle, les tests embryo-larvaires de bivalves marins sont parfaitement standardisés [11] ; différentes simplifications ont été proposées (utilisation de récipients de faible volume en matériel jetable, lecture directe sur microscope inversé) [12, 13], permettant d'envisager une éventuelle conduite de tests «in situ».

En effet, depuis quelques années, à la suite des travaux de Munawar et Munawar [14] sur le phytoplancton, de Sasson-Brickson et Burton [15] chez *Ceriodaphnia dubia* et de Norrgren et Degerman [16], des tests «in situ» ont été proposés en eau douce pour évaluer la qualité des eaux et des sédiments [17–20]. Les travaux sont par contre peu abondants en milieu marin ou saumâtre, si l'on excepte les expériences d'exposition en cages de moules adultes [21] ou de juvéniles [22] et concomitamment à nos propres travaux, ceux de Beiras et al. [23], concernant *Paracentrotus lividus*.

Les stades embryonnaires et larvaires des invertébrés marins sont beaucoup plus sensibles aux effets des altérogènes [3] que les stades plus âgés ; pourtant ils n'ont jamais été utilisés jusqu'à ces dernières années dans le cadre de bioessais in situ. Ceci est vrai en particulier chez les bivalves qui présentent les plus grands avantages, compte tenu de la rapidité des réponses et de la sensibilité de ce matériel biologique [24]. Des essais préliminaires réalisés chez *Mytilus galloprovincialis* en hiver et chez *Crassostrea gigas* en période estivale nous ont montré que ceci était parfaitement réalisable.

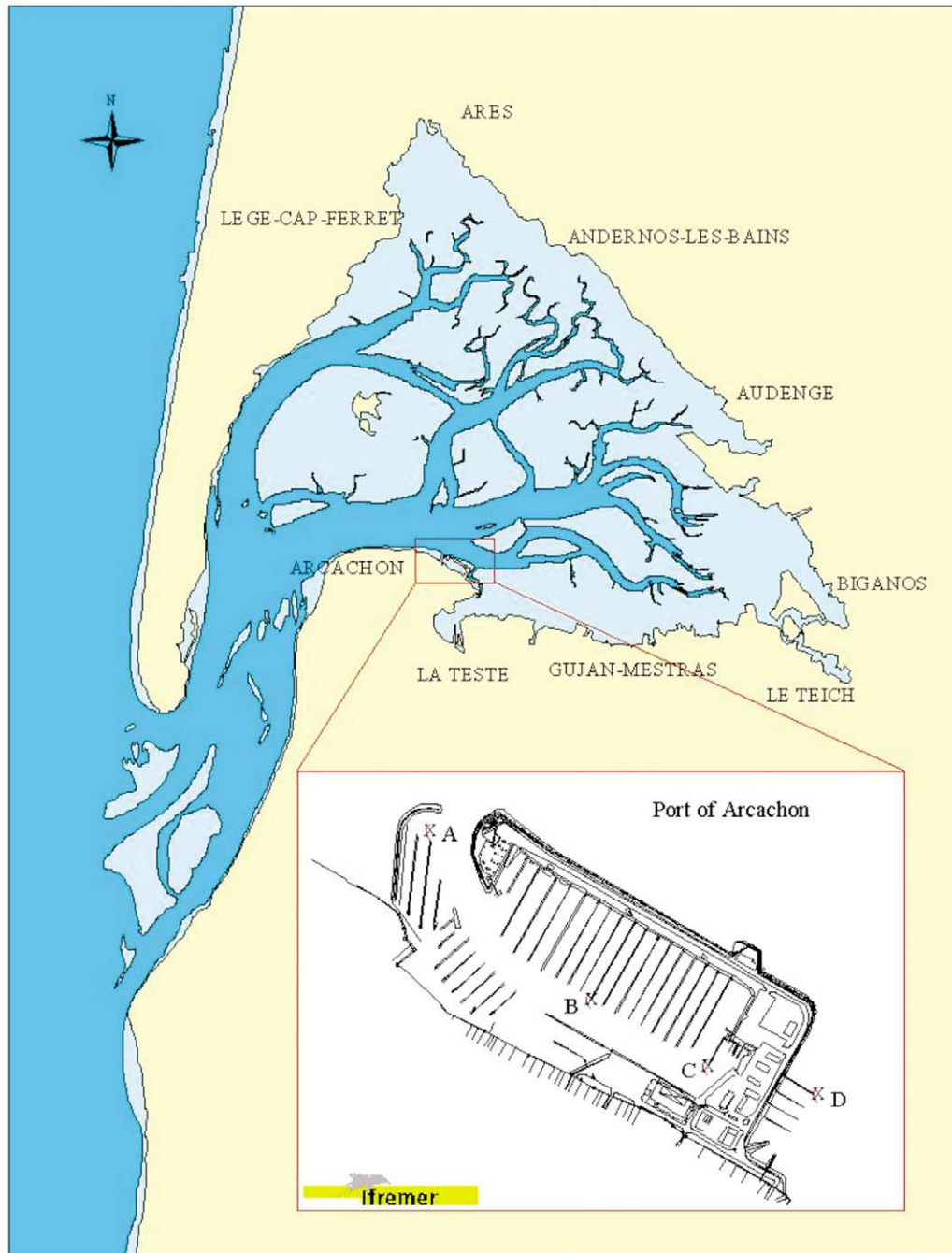
## 2. Techniques

### 2.1. Le site

La qualité biologique de l'eau du port d'Arcachon a été étudiée (figure 1). Il s'agit d'un port en eau profonde dont l'échange à la marée est incomplet (compris entre 20 et 60 % du volume total du port pour des coefficients de marée respectifs de 35 et 115). Ses 2 400 places sont occupées par des navires de plaisance de taille moyenne, la majorité jaugeant moins de 57 tonnes. Plus de 80 % d'entre eux ne quittent jamais leur amarrage même pendant la saison estivale. La navigation de plaisance, en augmentation constante, s'accompagne de pollutions, dues en particulier au grand nombre de navires habités en été. Il faut ajouter, dans la partie est, l'existence d'un port de pêche côtière, dont la flotte est composée à l'heure actuelle d'une trentaine de bateaux de plus de dix mètres.

Les observations ont été faites à 1 m de profondeur, à l'entrée (A), dans la partie médiane (B), et au fond (C) du port d'Arcachon ainsi qu'à l'extérieur de la digue (D), au niveau du port de travail, qui donne directement sur un chenal du bassin (Arams). Les dates suivantes ont été retenues compte tenu de la disponibilité de géniteurs mûrs pour effectuer les tests :

- période hivernale (*M. galloprovincialis*), du 10 au 14 janvier 1999.
- période estivale (*C. gigas*) les 15, 27 et 30 juin et 21 juillet 2000.

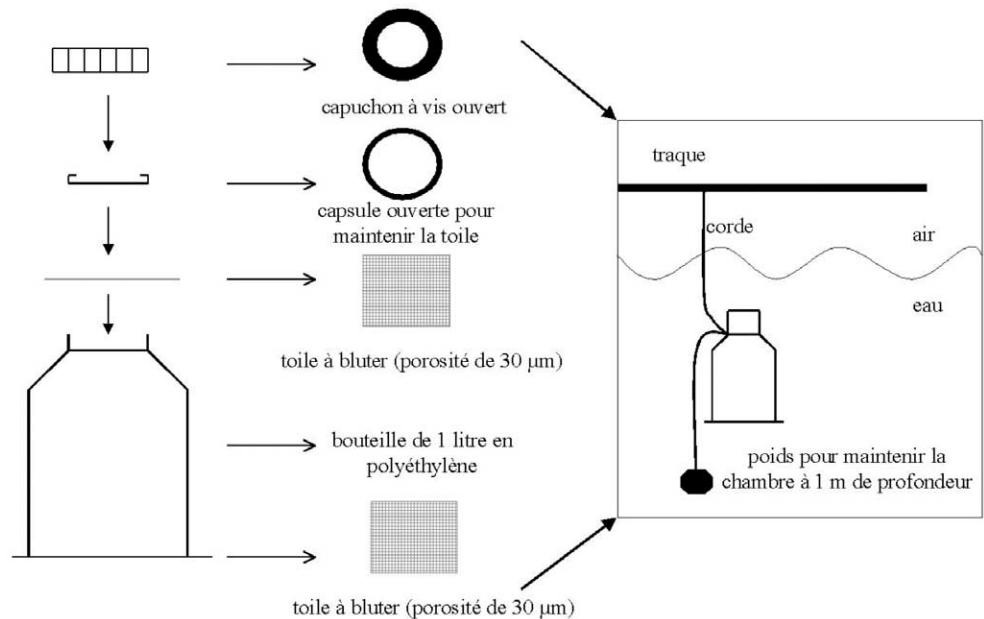


**Figure 1.** Le port de plaisance d’Arcachon, avec les points d’observation, dans le port lui même (A, B et C) et dans le chenal d’Arans (D).

## 2.2. Matériel biologique

La technique utilisée pour la conduite des tests embryolairaires chez les bivalves a été décrite par ailleurs [12, 13]. Nous ne ferons qu’en rappeler les grandes lignes. Les gamètes sont obtenus par stimulation thermique de géniteurs prélevés dans le milieu naturel, dans le cas présent. Après comptage des ovocytes en eau de mer filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$  (EMF), on procède aux fécondations avec du

sperme fraîchement émis. Au bout de dix minutes, les œufs fécondés sont répartis à raison de 60 par mL dans des récipients expérimentaux (de 3 à 5 répliquats par eau de mer à tester et pour les témoins). A l’issue d’une période d’incubation qui varie de 24 h chez les huîtres à un minimum de 48 h chez les moules, le contenu des récipients expérimentaux est formolé et les anomalies larvaires dénombrées sur 100 individus par pot. Le test est considéré comme valable si dans ces derniers, moins de



**Figure 2.** Présentation des chambres d'exposition in situ.

20 % des véligères sont anormales dans les récipients témoins (point D dans le présent cas sauf pour le 27 juin 2000).

### 2.3. Confection du matériel d'exposition « in situ » et mise en place des tests

Les chambres d'exposition sont construites à l'aide de bouteilles en polyéthylène (basse densité) de 1 L (figure 2). Le fond de chacune des bouteilles est découpé et recouvert à l'aide de toile à bluter en polyamide (porosité de 30 µm). Cette toile est soudée à chaud, évitant ainsi toute utilisation de colle, dont les différents types essayés se sont révélés toxiques vis-à-vis des embryons de bivalves. Afin de permettre la circulation de l'eau à travers la bouteille, la partie supérieure est également ouverte et recouverte de toile à bluter (porosité 30 µm). Cette toile est maintenue à l'aide d'une capsule et d'un capuchon à vis ouverts. Le temps de rétention de l'eau, dans les chambres ainsi préparées, a été estimé par utilisation d'une solution de rouge neutre, à 15 min.

Les différentes chambres d'exposition sont remplies d'EMF au laboratoire, puis ensemencées à l'aide de 60 000 œufs fécondés chacune ; elles sont acheminées dans un récipient contenant de l'EMF sur le site d'observation, immergées sous un mètre d'eau (3 par point) et lestées à l'aide d'un poids (pierre). La mise en place est effectuée dans l'heure qui suit les fécondations.

Lorsque les larves D sont formées, les pots sont ramenés au laboratoire, et les larves sont récupérées sur tamis inox de porosité 32 µm, puis formolées pour observation au microscope (détermination des pourcentages d'anomalies larvaires).

### 2.4. Traitement statistique

Les pourcentages d'anomalies larvaires sont déterminés sur chaque pot [13]. La moyenne des trois répliquats est

calculée pour chaque point, avec intervalle de confiance au seuil de sécurité de 95 %.

## 3. Résultats

### 3.1. Période hivernale

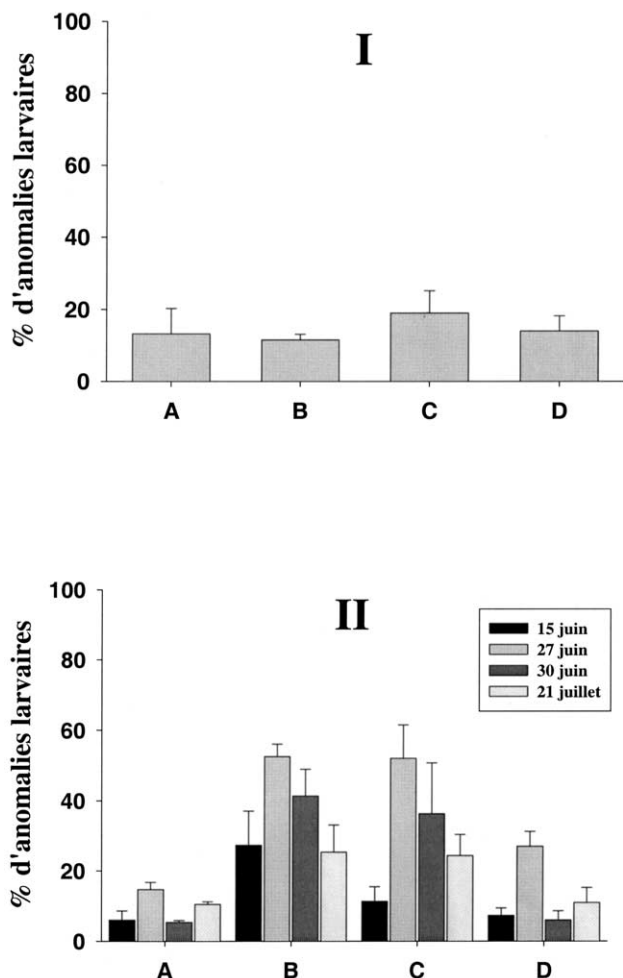
Les œufs fécondés de *M. galloprovincialis* ont été exposés le 10 janvier 1999 en période de mortes eaux (coefficient 41) ; les larves D n'ont été formées qu'après 4 jours. En effet, la température de l'eau de mer a varié de 9,8 à 10,4 °C, pour une salinité moyenne de 31. Les pourcentages d'anomalies larvaires dans les témoins (D, chenal d'Arams) se situent en dessous du seuil limite des 20 % d'anomalies larvaires, avec une valeur de  $14,0 \pm 4,2$  % (figure 3-I). Aucune action sur la qualité biologique des eaux du port n'a pu être observée, puisque le pourcentage le plus élevé n'est que de  $19,0 \pm 6,2$  % (point C).

### 3.2. Période estivale

Quatre séries d'observations ont été réalisées à l'aide d'œufs fécondés de *C. gigas* pendant l'été 2000. En juin, la température de l'eau du port a varié de 19 à 22,4 °C et la salinité est restée stable (31). En juillet, la température a varié de 21 °C à 22,4 °C, et la salinité était la même que précédemment. Les résultats sont présentés dans la figure 3-II.

Le 15 juin (coefficient de marée de 70), les pourcentages d'anomalies larvaires sont restés peu élevés à l'exception du point B, dans la partie moyenne du port ( $27,3 \pm 9,7$  %).

Le 27 juin en période de mortes eaux (coefficient de 48), d'importantes perturbations ont été observées aux points B et C, avec respectivement  $52,5 \pm 3,5$  % et  $52,0 \pm 9,5$  % d'anomalies larvaires. On notait encore  $27,0 \pm 4,2$  % d'anomalies au point D ; par contre celles-ci n'atteignaient



**Figure 3.** Pourcentages d'anomalies larvaires obtenus chez *M. galloprovincialis* (I, 10/01/99) et *C. gigas* (II, été 2000) lors des tests d'embryotoxicité in situ. A, B, C et D correspondent aux différents points d'observation (voir figure 1).

que  $14,7 \pm 2,0$  % à l'entrée du port (A), ce qui permettait de valider le test, puisque nous étions, sur ce dernier site, au-dessous de la limite des 20 % d'anomalies larvaires.

Le 30 juin (coefficient de marée 70), on observe encore une dégradation marquée de la qualité biologique de l'eau du port, de la zone moyenne (B) à la zone la plus confinée (C), avec les pourcentages respectifs de  $41,3 \pm 7,6$  et  $36,4 \pm 14,3$  % ; à l'inverse, à l'entrée (A) et dans le chenal d'Arams (D), les valeurs obtenues sont très basses ( $5,3 \pm 0,6$  et  $6,0 \pm 2,5$  % d'anomalies larvaires seulement).

Enfin le 21 juillet, en période de vives eaux (coefficient de marée de 75), les différences précédemment notées se sont atténuées, avec des valeurs très proches aux points B ( $25,3 \pm 7,8$  %) et C ( $24,3 \pm 6,0$  %), toutefois supérieures aux pourcentages notés à l'entrée du port (A :  $10,5 \pm 0,7$  % d'anomalies) et dans le chenal d'Arams (D :  $11,0 \pm 4,2$  %).

#### 4. Discussion et conclusions

Les pourcentages d'anomalies larvaires au point de référence (D) se situent, à une exception près (27 juin),

nettement en dessous de la valeur seuil des 20 %, qui est retenue par les auteurs pour estimer la valeur des tests embryo-larvaires chez les bivalves marins [11–13]. Ceci est valable pour les deux espèces utilisées, *C. gigas* et *M. galloprovincialis* ; ainsi aucune anomalie, liée soit aux matériaux soit au dispositif utilisés, n'a pu être mise en évidence. Une exception est toutefois à noter, le 27 juin 2000 : les eaux du point D sont de qualité biologique moyenne, le point A pouvant alors servir de référence. Les observations dans ce cas ont été effectuées par très faible coefficient de marée (valeur de 48), donc avec un renouvellement réduit de l'eau de mer dans le secteur. C'est d'ailleurs à cette date que les plus mauvais résultats concernant la qualité biologique de l'eau ont été obtenus sur les différents sites étudiés. Il n'existe d'ailleurs que de faibles différences entre les données obtenues à l'entrée ou à l'extérieur du port. Cependant, ces situations favorables, présentant un point ayant moins de 20 % d'anomalies ne se produiront pas nécessairement en zone littorale fortement contaminée. L'adjonction d'élevages témoins, dans ce cas précis, est donc nécessaire. La solution que nous avons utilisée dans les études ultérieures, a été la mise en place in situ de 3 bouteilles en polyéthylène supplémentaires contenant l'EMF et les œufs fécondés, mais totalement hermétiques ; le matériel biologique de ces témoins a été ainsi soumis aux mêmes conditions thermiques que celui des chambres d'exposition.

Bien qu'aucune perturbation de la qualité biologique de l'eau de mer n'ait été observée en période hivernale sur le site étudié, et malgré le temps de réponse plus important, compte tenu des basses températures enregistrées, il est possible de réaliser des tests in situ en hiver ; or c'est à cette époque que dans le bassin d'Arcachon par exemple, comme dans la plupart des centres conchylicoles où les huîtres se reproduisent, on procède aux opérations de dragage dans les ports ; les tests embryo-larvaires de bivalves peuvent donc être proposés pour étudier l'impact des ces opérations.

On sait par ailleurs que la moule méditerranéenne, *M. galloprovincialis*, outre une vaste aire de répartition géographique, est une espèce bradyctique, se caractérisant par la présence dans les populations naturelles de sujets mûrs toute l'année [2]. Les moules peuvent donc être utilisées à la place des huîtres, lorsque la température de l'eau de mer se situe nettement en dessous des 20°C qui sont nécessaires au bon développement larvaire de *C. gigas*. Enfin les deux espèces, qui colonisent à l'état naturel les zones côtières ainsi que les baies et les estuaires, sont euryhalines ; leur embryogenèse n'est pas perturbée jusqu'à la salinité de 20 [25]. Il est donc tout à fait envisageable d'effectuer des observations, dans les baies et estuaires où des perturbations anthropiques sont suspectées (développement récent des activités agricoles, en particulier). En ce qui concerne le milieu marin lui-même, qui sert encore trop souvent de réceptacle à de nombreuses activités humaines (rejets urbains ou industriels, boues de dragage), il devient possible par les tests d'embryotoxicité in situ de bivalves, d'étudier les nuisances engendrées

de façon beaucoup plus réaliste que lors d'observations en laboratoire. Comme le rappellent les auteurs, les premiers rendent mieux compte des effets biologiques des polluants que les seconds [17, 22, 23, 26, 27]. Plusieurs raisons justifient cette position. Les épisodes toxiques peuvent être sous-estimés par des prélèvements ponctuels et certains toxiques volatiles ou labiles peuvent disparaître lors de l'acheminement des échantillons au laboratoire. De plus, in situ, le matériel biologique se trouve soumis à des conditions environnementales naturelles, intégrant les effets de site sur plusieurs séquences temporelles (variations des conditions de milieu en fonction de la marée et conditions thermiques non constantes, par exemple). Pereira et al. [19] résument parfaitement les raisons qui amènent les écotoxicologues à se tourner, dans la mesure du possible, vers l'utilisation de tests in situ : l'élimination des artéfacts liés au prélèvement et au stockage des échantillons ; de plus, les conditions qui régissent la toxicité et la bio-disponibilité des contaminants ne peuvent souvent pas être reproduites de façon précise en laboratoire.

## Références

- [1] Prytherch H.F., Experiments in the artificial propagation of oysters, Rep. U.S. Com. Fish., 1924, XI, 14 p.
- [2] His E., Beiras R., Seaman M.N.L., The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve larvae, Adv. Mar. Biol. 37 (1999) 1–178.
- [3] Stebbing A.R.D., Akesson B., Calabrese A., Gentile J.H., Jensen A., Lloyd R., The role of bioassays in marine pollution monitoring, Rapp. P.-v Réuni. Cons. Int. Explor. Mer 179 (1980) 322–332.
- [4] Woelke C.E., Bioassay the bivalve larvae tool, Proceedings of the Northwest Symposium on Water Pollution Research, US Dept. HEWPHS, Portland, Oregon, 1961, pp. 113–123.
- [5] Woelke C.E., Measurement of water quality with the Pacific oyster embryo bioassay, Water Quality Criteria, ASTM STP 416, American Society for Testing and Materials, 1967, pp. 112–120.
- [6] Woelke C.E., Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo, Wash. Dep. Fish. Tech. Rep. 9 (1972) 1–93.
- [7] Dimick R.E., Breese W.P., Bay mussel embryo bioassay, Proc. 12th Pacific Northwest Industrial Waste Conf., Univ. Wash. College Engng Dpt. Civil Engng, 1965.
- [8] Wilson D.P., A biological difference between natural waters, J. Mar. Biol. Ass. UK 30 (1951) 1–21.
- [9] Bougis P., Sur le développement des pluteus in vitro et l'interprétation du test de Wilson, C. R. Acad. Sci. Paris. 259 (1964) 1250–1253.
- [10] Bougis P., Utilisation des larves d'oursins pour des tests biologiques, Les Colloques de l'INS, les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique, INSERM 106, 1981, pp. 415–419.
- [11] American Society for Testing and Materials, Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs, ASTM, E 724-89, Philadelphia, PA, 1989.
- [12] His E., Beiras R., Monitoring fresh and brackish water quality around shellfish farming areas with a bivalve embryo and larva simplified bioassay method, Oceanol. Acta. 18 (1995) 591–595.
- [13] His E., Seaman M.N.L., Beiras R., A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment, Wat. Res. 31 (1997) 351–355.
- [14] Munawar M., Munawar I.F., Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of in situ sediment contaminants, Hydrobiol. 149 (1987) 87–105.
- [15] Sasson-Brickson G., Burton G.A., In situ and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia*, Environ. Toxicol. Chem. 10 (1991) 201–207.
- [16] Norrgren L., Degerman E., Effects of different water qualities on the early development of Atlantic salmon and brown trout exposed in situ, Ambio. 22 (1993) 213–215.
- [17] Crane M.P., Delaney P., Maidstone P.M., Clarke S., Measurement by in situ bioassay of water quality in an agricultural catchment, Wat. Res. 29 (1995) 2441–2448.
- [18] Crane M., Higman M., Olsen T., Simpson P., Callaghan A., Fisher T., Kheir R., An in situ system for exposing aquatic invertebrates to contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem. 19 (2000) 2715–2719.
- [19] Pereira A.M., Soares A.M.V.M., Gonçalves F., Ribeiro R., Test chambers and test procedures for in situ toxicity testing with zooplankton, Environ. Toxicol. Chem. 18 (1999) 1956–1964.
- [20] Sibley P.K., Benoit D.A., Balcer M.D., Phipps G.L., West C.W., Hoke R.A., Ankley G.T., In situ bioassay chamber for assessment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrate, Environ. Toxicol. Chem. 18 (1999) 2325–2336.
- [21] Salazar M.H., Salazar S.M., In situ bioassays using transplanted mussels: I Estimating chemical exposure and bioeffects with bioaccumulation and growth, in : Hughes J.S., Biddinger G.R., Mones E. (Eds.), Environmental Toxicity and Risk Assessment, vol. 3, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1995, pp. 216–241.
- [22] Warrin L.W., Klaine S.J., Finley M.T., Development of a field bioassay with juvenile mussels, J. North. Am. Benthol. Soc. 14 (1995) 341–346.
- [23] Beiras R., Vasquez E., Bellas J., Lorenzo J.L., Fernandez N., Macho G., Mariño J.C., Casas L., Sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of the biological quality of coastal seawater, Estuar. Coast. Shelf Sci. 52 (2001) 29–32.
- [24] Widdows J., Marine and estuarine invertebrate toxicity tests, in : Calow P. (Ed.), Handbook of Ecotoxicology, Blackwell, Oxford, 1993, pp. 145–166.
- [25] His E., Robert R., Dinot A., Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*, Mar. Biol. 100 (1989) 455–463.
- [26] Meregalli G., Vermeulen A.C., Wakabayashi M., The use of chironomid deformation in an in situ test for sediment toxicity, Ecotox. Environ. Saf 47 (3) (2000) 231–239.
- [27] Pereira A.M.M., Soares A.M.V.M., Gonçalves F., Ribeiro R., Water-column, sediment, and in situ chronic bioassays with cladocerans, Ecotox. Environ. Saf. 47 (1) (2000) 27–39.
- [28] His E., Heyvang I., Geffard O., de Montaudouin X., A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassay for toxicological studies, Wat. Res. 7 (1999) 1706–1718.